心臓病薬の RRHT 分析 の速度、感度、分解能の調整

アプリケーション

医薬品

著者

John W. Henderson Jr. and William J. Long
Agilent Technologies
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

要約

窒素を含有する数種の心臓病治療薬について、ZORBAX Rapid Resolution(RR)3.5μmカラムと、Rapid resolution HT(RRHT)1.8μmカラムで、分離検討を行いました。分析メソッド開発の上で重要なポイントは分析時間、分離、感度ですが、RRカラム、RRHTカラムを使用してメソッド開発することで、これら3項目について最も満足できるメソッドを、素早く構築することができます。このアプリケーションノートでは、RRカラムとRRHTカラムを使い、分析時間、分離、感度の比較を行いました。更に、3項目で最善の結果が得られた条件について、カラム温度を変更して分析することで、分離がシビアな成分の選択性の変更、分離の改善が行えるかを検討しました。

緒言

分析時間、分離、感度の三角図

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)の分析時間、分離、感度の関係においては、何れかの項目を満足させる場合、別の項目については妥協しなければなりません。この関係は、しばしば三角図(図1)で表されます。例えば、一般的に使われる4.6×150～250mm、粒子径5～10μmのカラムでメソッド開発を行う場合、長さ150mmのカラムで十分な分離が得られなければ、長さ250mmのカラムを使用する事になりますが、この場合、分析時間が余計に掛かり、また、感度も低下してしまいます。

同じ問題は、Rapid Resolution(RR)カラムとRapid Resolution HT(RRHT)カラムでも生じます。しかしながら、RRHTでは、3項目の関係を三角図に模式した場合、そのモデルが通常のカラムのものよりも小さいため、2つの項目を最適化した場合も、残りの1項目への影響はほと

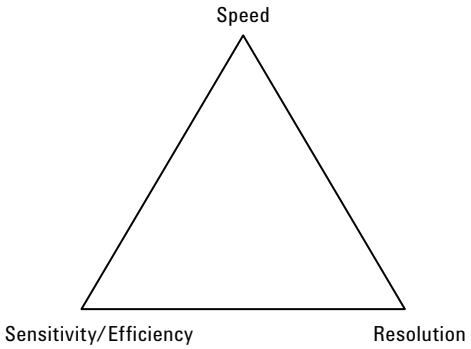


図 1.　三角図

んどありません。RRHTでのメソッド開発においては、カラム温度、圧力、溶媒組成などの検討が、重要となっています。

本アプリケーションノートでは、心臓病治療薬の混合物(構造式とpKaは図2を参照)について、RRカラムとRRHTカラムを使用して分析した時のクロマトグラムと分析時間、分離、感度の関係を示し、これらの向上がRRHT技術により成り立っていることを示します。

実験

全てのクロマトグラムはAgilent 1200 Rapid Resolution LC(RRLC)にて採取しました。カラムは、ZORBAX Stable Bond C18(SB-C18)の内径4.6mm、長さ50～250mm、粒子径1.8～3.5 μmを使用しました。移動相Aには、0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)の5%アセトニトリル溶液、移動相Bには0.08%TFAの95%アセトニトリル溶液を用いました。移動相BにTFAを添加した理由は、グラジエント分析を行う際のベースライン上昇を抑えるためです。移動相の流速は2mL/minとしました。グラジエントプロファイルは、質量分布比(k*)が一定となるよう、カラム長さに応じ変更しました。

表 1.　質量分布比 k*を一定に保つグラジエントプロファイル

% B	50 mm	150 mm	250 mm
12.5	0 分	0 分	0 分
60	3.5	10.5	17.5
60	4	12	20
12.5	4.01	12.01	20.01

結果と考察

3 つのカラムコンフィグレーションでの分離の比較

図 3に3本のカラムのクロマトグラムを示します。それぞれ、ほぼ同様な溶出パターンを示しています。これは、ZORBAXでは同一の結合相(今回であれば、SB-C18)で1.8～5 μmの粒子径の充てん剤を供給できているためであり、これにより、5 μmや3.5 μmの粒子径の充てん剤を詰めた長いカラムから、1.8 μmの 粒子径の充てん剤を詰めた短いカラムまでで、スケーラビリティを保つことができます。

図3では短いカラム、短い時間の分析でも十分な分離をしていますが、最もよく分離しているカラムを選ぶなら、クロマトで一番接近した成分同士(図3のピーク3と4)の分離度が最も大きいカラム、即ち4.6×250mm、粒子径3.5 μmのカラムが、選択されます。

3 つのカラムコンフィグレーションでの速度の比較

図 4は、図3のクロマトグラムを同じ時間軸で表したものです。この図から、従来のカラムを1.8 μmのRRHTカラムに置き換えるだけで、容易に分析時間を短縮できることが分かります。分析時間の短縮がカラム選択を行う際の最も重要なポイントであれば、4.6×50mm、粒子径1.8 μmのカラム(図4の一番下のクロマトグラムを採取したときのカラム)が、最良のカラムとなります。このカラムでは、長さ250mmのカラムと比較して4倍の高速化を実現しつつ、ピーク3と4の分離度は2.0と、十分な値を保っています。

3 つのカラムコンフィグレーションの感度/効率の比較

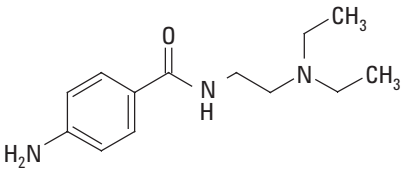
図 3 と 4 では、グラジエントプロファイルと同様、注入量はカラム長さに応じ変更したため、ピーク高さの実測値のみでは感度の比較ができません。しかし、注入量とピーク高さの比較により、間接的に感度を比較することができます。表2は、3本のカラムでのプロプラノロール(図3のピーク7)のデータです。この表では、カラム長さに対する注入量の減少値に比例してピーク面積値も減少していますが、ピーク高さに注目すると、粒子径1.8 μmのカラムは注入量の減少値と同程度まで減っておらず、30%程度、感度が上昇しています。アイソクラティック分析であれば、より短いカラムからより早く溶出する成分ほど拡散が抑えられるため、感度が上昇しますが、今回のグラジエント分析のケースでは、3本のカラムの分析それぞれでk*が一定に保たれているので、ピーク高さで約30%の感度上昇は、粒子径3.5 μmのカラムより粒子径

表 2.　3 つのカラムコンフィグレーションでの感度比較

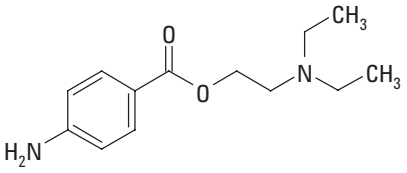
カラム	標準化 注入量	面積	面積値の 差 (%)	高さ	ピーク高さの 差 (%)	感度 ゲイン (%)
4.6 x 250 mm、3.5 μm	100	817		226		
4.6 x 150 mm、1.8 μm	60	510	62	201	89	27
4.6 x 50 mm、1.8 μm	20	178	22	112	50	28

1. Procainamide, pKa = 9.2
2. Procaine, pKa = 9.0
3. Nadolol, pKa = 9.7
4. Pindolol, pKa = 8.8
5. Lidocaine, pKa = 7.8
6. Disopyramide, pKa = 10.4
7. Propranolol, pKa = 9.5
8. Nifedipine
9. Nimodipine
10. Nisoldipine

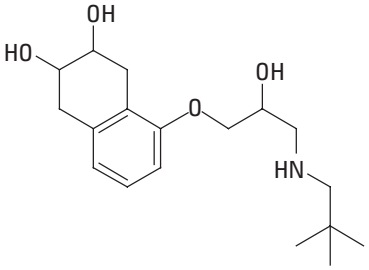
1



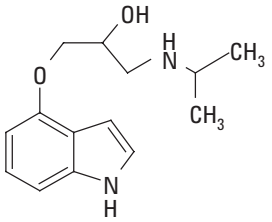
2



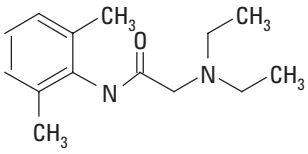
3



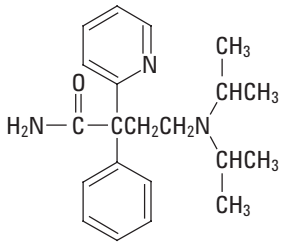
4



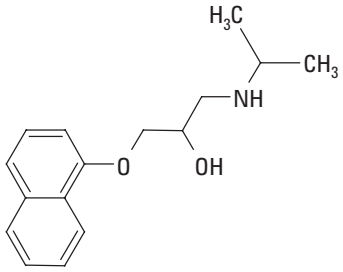
5



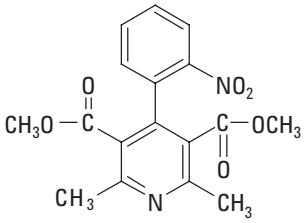
6



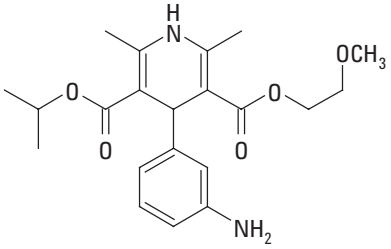
7



8



9



10

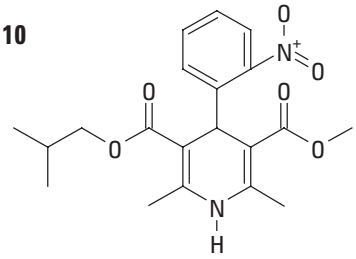


図 2.　心臓病治療薬の構造式と pKa 値 (溶出順に記載)

1.8μmのカラムが高効率である、という証になります。ここで、長さ150mm、粒子径1.8μmのカラムのデータと長さ50mm、粒子径1.8μmのデータに注目してください。両者に感度差が見られません。先述のとおり、カラム長さでの感度差は、アイソクラティック分析で現れます。感度がカラム選択を行う際の最も重要なポイントであれば、約30%の感度上昇が見られた粒子径1.8μmのカラムが適切です。とりわけ、4.6×150mm、粒子径1.8μmのカラム(図3の中央のクロマトグラムを採取したカラム)が、長さ50mmのカラムよりも分離がよく、また、長さ250mmのカラムよりも分析時間が短くなっています。

ハイスループット分析でのシステム圧を検討する

2ミクロン以下の充てん剤のカラムで高速分析を行う場合、カラム自身の圧損を含む高いシステム背圧は避けて通れないものです。しかし、ZORBAXは、ゾルーゲル法を用いて製造された、とても強度のある充てん材のカラムです。また、独自技術による最良の粒度分布での充てんを行うことにより、他の2ミクロン以下のカラムより、背圧は低くなっています。図4では、それぞれ3本のカラムでのシステム圧をbarで示しています。長さ150mm、粒子径1.8 μmのカラムを使用して分析したときは、分析時間、分離、感度それぞれが満足できるのですが、圧力

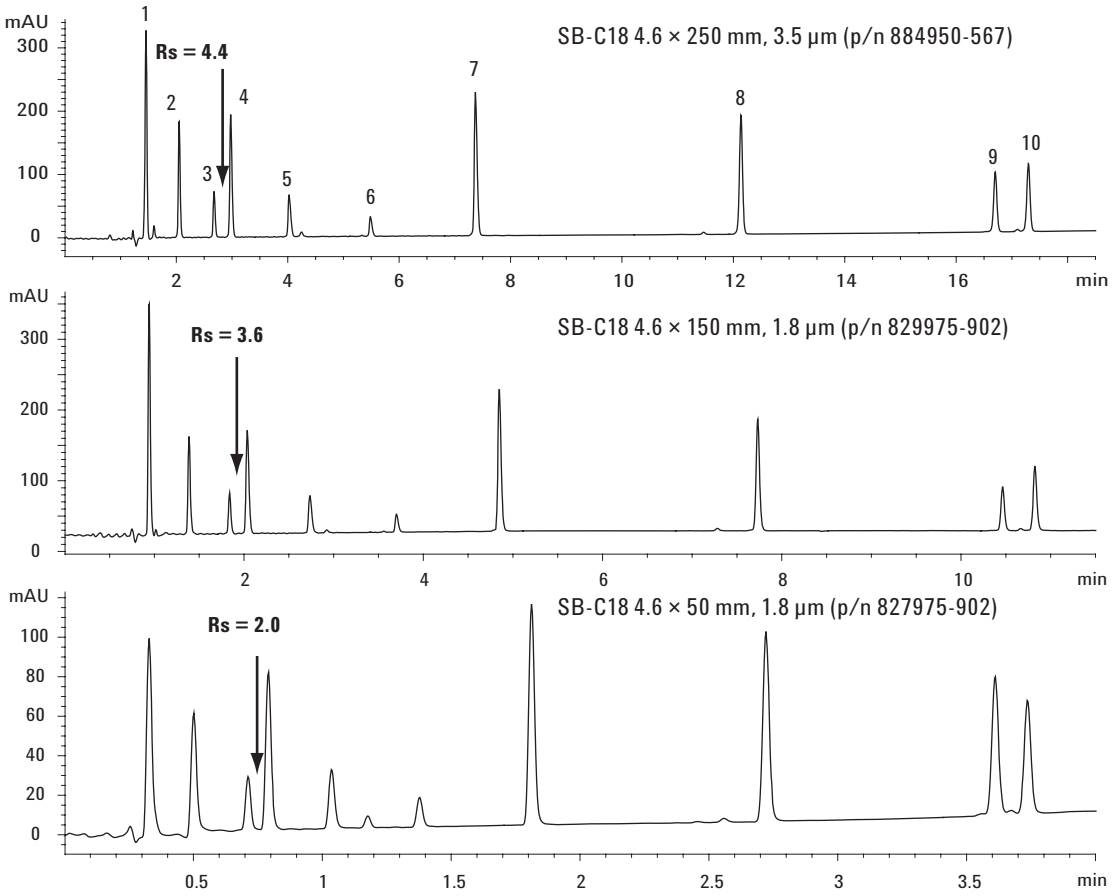


図 3.　SB-C18 カラム　各コンフィグレーションの近接ピークの分離への影響

が、他の2本と比べ若干高めです。しかし、1200RRLCシステム(耐圧600bar)の範囲内であり、1200RRLCで分析を行うのであれば、全く問題はありません。他の2本のカラムでは、圧力が400bar以下と十分に低いので、通常の1200や1100で分析を行うことができます。

豊富なカラムバリエーション

本アプリケーションノートでは3本のカラムのみの比較ですが、これらのカラム以外にも、ZORBAXには様々なコンフィグレーションのカラムがあり、目的に応じて使うことができます。カラムサイズは、長さ20～250mm、内径は1.0、2.1、3.0、4.6mm、粒子径は1.8、3.5、5μmの範囲で、実に90種類以上あります。各カラムコンフィグレーションには、それぞれ特長があります。一般に、一定の条件で分析する場合(グラジエント分析ではカラム長さに応じグラジエントプロファイル変えk*を一定に保つ)、より長いカラムのほうが分離はよくなります。しかし、カラムが長くなれば分析時間が掛かります。こういった場合は、充てん剤の粒子径を細かくし、カラムの長さを短くすることで、分離を保ったまま分析時間を高速化することができます。短いカラムの使用は、グラジエント分析を行う際の再平衡化時間の短縮にも繋がります。今回の心臓病治療薬の分析例では、長さ250mmの

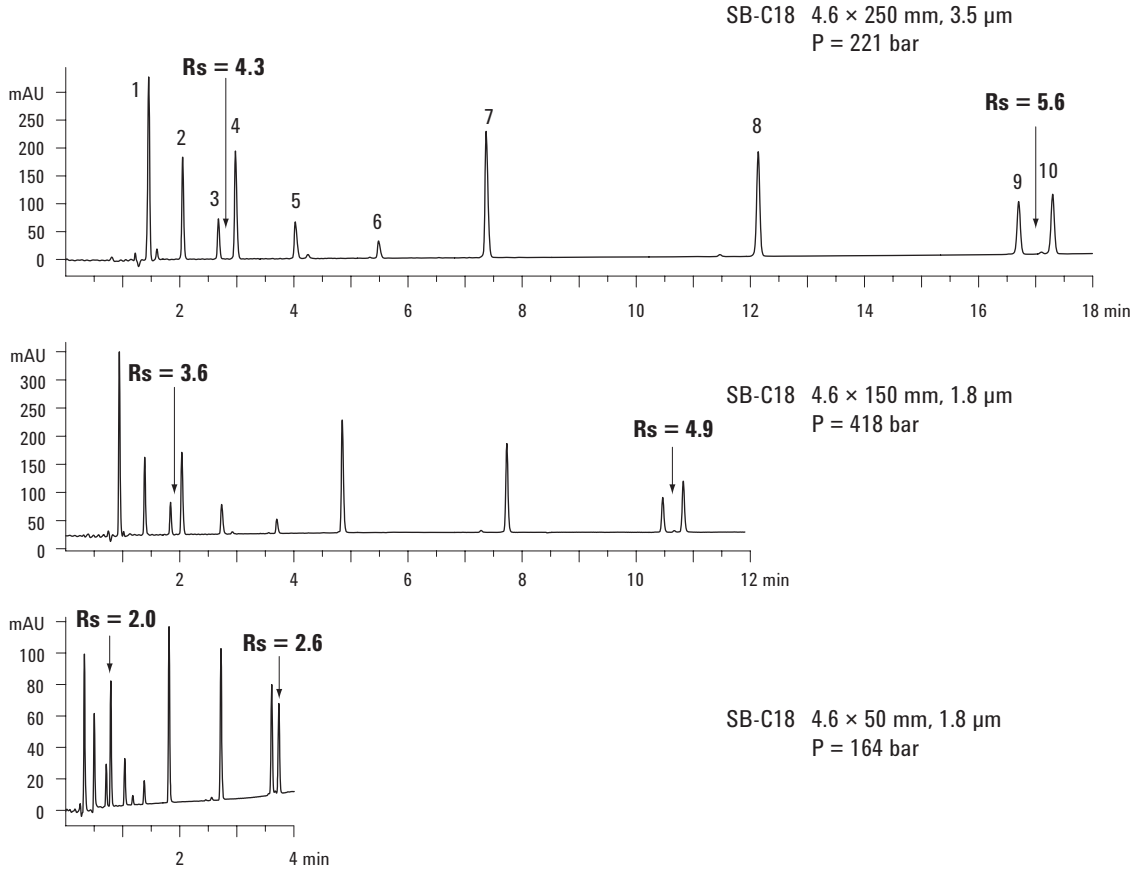


図 4.　SB-C18 カラム　各コンフィグレーションの分析時間、圧力への影響

表 3.　カラムコンフィグレーションの違いによるグラジエント分離の結果　(K* は一定に保持)

カラムコンフィグレーション 長さ (mm)	粒径 (μm)	流量 (mL/min)	分離特性 近接成分の分解能	分離特性 グラジエント時間 (分)	圧力 (bar)
250	3.5	2	4.4	20	221
150	1.8	2	3.6	12	418
50	1.8	2	2	4	164

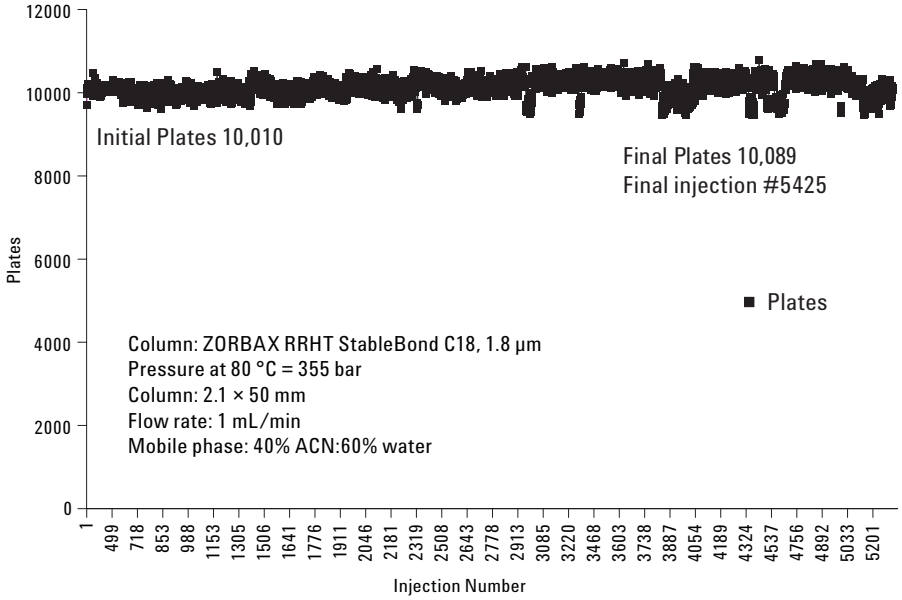


図 5.　高温時の SB-C18 RRHT の耐久性

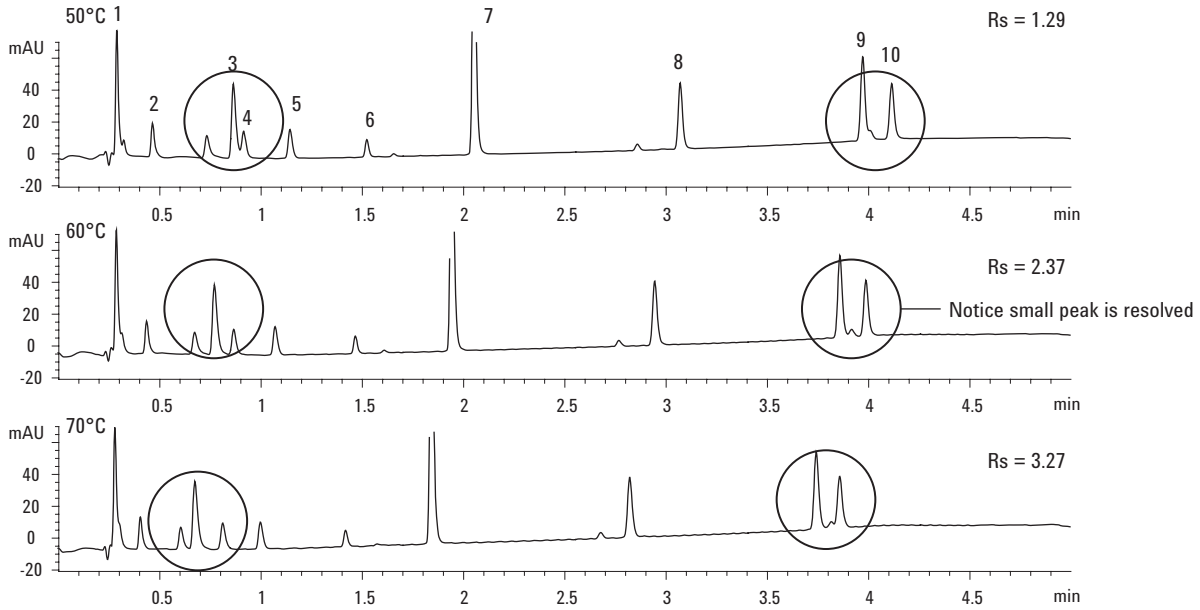


図 6.　カラム温度の違いと分離への影響

カラムを使ったときの再平衡化時間が4分であったのに対し、長さ50mmのカラムの再平衡化時間は0.8分と、250mmの時の僅か1/5でした。

カラム温度の選択性への影響

今までの例で、ZORBAX RRHTカラムは、分析時間、分離、感度の面で優れていることを示しました。これらに加え、SB-C18 RRHTカラムは、カラム温度90℃まで安定であるという優れた点も持っています。温度の変更はカラム恒温槽の温度設定を変更するだけで容易に行え、それでいて、選択性の変更、分離の向上、システム背圧の低減に繋がる有効な手段です。図6では、温度の違いがクロマトグラムにどう影響したかを示しています。○印を付けた内、9番目のピークと10番目のピークのところに注目してください。カラム温度50℃では、9番目のピークに未知成分のショルダーピークが見られますが、60℃では未知成分が分離しています。一方、70℃の場合は、逆に10番目のピークと未知成分が近接し始めています。また、3番目と4番目のピークの分離を見ますと、50℃では分離不十分であったものが、60℃では十分に分離しています。これらから、この分析ではカラム温度60℃が最適であると分かります。

結論

HPLC分析では、分析時間、分離、感度／効率はそれぞれ関係しています。通常、これらの要因の一つが、他の二つの要因を向上させる際の犠牲となります。RRHT技術は、犠牲となってしまう要因の犠牲の度合いを和らげ、それぞれで十分に満足できる結果を導き出します。今回の実験では、分析時間、分離、感度／効率それぞれをどう最適化していくかを、実証しました。また、分離を向上させるパラメータとして、カラム温度を変更しての検討も実施しました。カラム温度を変更することで保持時間や選択性が変わり、分離の向上に繋がる場合があります。ZORBAX SB-C18は、高い温度で分析条件を検討する際に有用なカラムです。また、ZORBAX RRカラムとRRHTカラムには様々なコンフィグレーションがあり、分析時間、分離、感度について、それぞれのユーザーの目的に応じた分析メソッドのカスタマイズに適用することができます。

www.agilent.com/chem/jp

詳細情報

Agilent 製品とサービスの詳細については、Agilent のウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

Agilent は、本資料に誤りが発見された場合、また、本資料の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。
また、本資料掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。
著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本資料を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2006

Printed in Japan
December 7, 2006
5989-5899JAJP

Agilent Technologies